

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representation of
The original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication : 2 718 452

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

(21) N° d'enregistrement national : 94 04009

(51) Int Cl^e : C 07 K 14/135, 7/08, 1/36, A 61 K 39/155, C 12 N 15/45

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 06.04.94.

(30) Priorité :

(43) Date de la mise à disposition du public de la demande : 13.10.95 Bulletin 95/41.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du présent fascicule.*

(60) Références à d'autres documents nationaux apparentés :

(71) Demandeur(s) : PIERRE FABRE MEDICAMENT — FR.

(72) Inventeur(s) : Binz Hans, Thien N'Guyen Ngoc, Baussant Thierry et Trudel Michel.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire : Cabinet Regimbeau Martin Schrimpf Warcolin Ahner.

(54) Élément d'immunogène, agent immunogène, composition pharmaceutique et procédé de préparation.

(57) La présente invention concerne un polypeptide utilisable comme élément d'immunogène, caractérisé en ce qu'il est porté par la séquence peptidique comprise entre les résidus d'acides aminés 130 et 230 de la séquence de la protéine G du virus respiratoire syncytial du sous-groupe A et du sous-groupe B, ou par une séquence présentant au moins 80% d'homologie avec ladite séquence peptidique.

L'invention concerne également un agent immunogène ou une composition pharmaceutique contenant le polypeptide et leur procédé de préparation.

FR 2 718 452 - A1



Serial No.: 09/202,035

La présente invention se rapporte à des polypeptides utilisables notamment dans la préparation d'immunogènes et l'obtention de vaccin contre le virus respiratoire syncytial (VRS) et à des séquences nucléotidiques permettant de les obtenir. L'invention se rapporte également à une protéine adjuvante d'immunité extraite de *Klebsiella pneumoniae*, à des compositions contenant les polypeptides immunogènes, éventuellement associés à une telle protéine adjuvante, ainsi qu'à leur procédé de préparation.

Le virus respiratoire syncytial (VRS) est la cause la plus fréquente de maladies respiratoires chez le nouveau-né : bronchopneumopathies (bronchiolites). L'OMS estime chaque année 50 millions de cas atteints du VRS, dont 160 000 décès dans le monde entier. Il existe deux sous groupes du virus (sous groupes A et B).

Le VRS est classé dans la famille des Paramyxoviridae, genre pneumovirus comportant un génome ARN non segmenté, de polarité négative, codant pour 10 protéines spécifiques.

Il n'existe pas actuellement de vaccin disponible, contre le VRS. Les vaccins à virus inactivé se sont montrés inefficaces et ont même parfois aggravé les infections des nourrissons. Dans les années 60, les tentatives de vaccination avec le VRS inactivé à la formaline ont conduit à l'échec : au lieu de conférer une protection lors de la réinfection due au VRS, le vaccin a eu pour effet d'aggraver la maladie chez l'enfant.

La demande WO 87/04185 a proposé d'utiliser des protéines structurales du VRS en vue d'un vaccin, comme les protéines d'enveloppe appelées protéine F (protéine de fusion) ou protéine G, une glycoprotéine de 22 Kd, une protéine de 9,5 Kd, ou la protéine majeure de capsid (protéine N).

La demande WO 89/02935 décrit les propriétés de protection de la protéine F entière du VRS, éventuellement modifiées sous forme monomériques ou désacétylée.

Une série de fragments de la protéine F a été clonée en vue de rechercher leurs propriétés neutralisantes.

Toutefois les vaccins immunitaires testés à ce jour se sont montrés inefficaces ou ont induit une pathologie pulmonaire (bronchiolite ou péribronchite).

A l'heure actuelle il n'existe pas de traitement de fond des infections dues au VRS.

Les infections au VRS des voies aériennes supérieures : le traitement repose essentiellement sur les médications symptomatiques
5 identiques à celles des autres infections virales.

Les infections au VRS des voies aériennes inférieures : le traitement chez les nourrissons repose sur le maintien d'une hydratation correcte, l'aspiration des sécrétions et l'administration d'oxygène si besoin. Un effet positif a été observé avec la ribavirine, nucléotide actif in vitro contre le
10 VRS.

C'est pourquoi la présente invention a pour objet un polypeptide utile notamment dans la production d'immunogène, caractérisé en ce qu'il est porté par la séquence peptidique comprise entre les résidus d'acides aminés 130 et 230 de la séquence de la protéine G du virus respiratoire
15 syncytial, ou par une séquence présentant au moins 80% d'homologie avec ladite séquence peptidique. Cette séquence diffère pour les sous-groupes A et B.

La protéine G est une glycoprotéine d'enveloppe du VRS, de poids moléculaire compris entre 84 et 90 Kd, pauvre en méthionine.

20 La Demanderesse a mis en évidence que la séquence comprise entre les acides aminés 130 et 230 de la protéine G naturelle est particulièrement appropriée pour induire une protection efficace contre l'infection par le VRS, sous-groupes A et B.

Plus particulièrement la présente invention concerne deux
25 polypeptides (sous groupes A et B) utiles notamment comme élément d'immunogène compris dans le précédent et qui comporte la séquence peptidique comprise entre les résidus aminoacides numérotés 174 et 187 de la protéine G du VRS ou une séquence présentant au moins 80% d'homologie avec la séquence correspondante.

30 Parmi les variants des séquences précédentes, il faut citer les polypeptides qui comportent une séquence dans laquelle :

- a) l'acide aminé Cys en positions 173 et/ou 186 à été remplacé par un aminoacide ne formant pas de pont disulfure en particulier la serine, et/ou
- b) les acides aminés en positions 176 et 182 sont susceptibles de former un pont covalent autre qu'un pont disulfure notamment l'acide aspartique et l'ornithine.

Ainsi, la séquence polypeptidique 130-230 du VRS sous-groupe A peut être utilisée complète, sous sa forme native. Cette séquence correspond à la séquence notée Seq id n° 1 (ou G2A).

- De même, on peut utiliser la séquence polypeptidique complète 130-230 du VRS sous groupe B, sous sa forme native. Cette séquence correspond à la séquence notée Seq id n° 2 (G2B).

La sequence id n° 1 sera notée G2A dans la suite de la demande.

La séquence id n° 2 sera notée G2B dans la suite de la demande.

- Des séquences présentant au moins 80% d'homologie avec G2A ou G2B sont également appropriées

La séquence comprise entre les acides aminés 130 et 230, peut être modifiée par le remplacement des résidus cystéine en positions 173 et 186 par des résidus sérine pour obtenir un peptide conservant de bonnes propriétés immunogènes, grâce au maintien de la boucle formée par les résidus Cys en positions 176 et 182. Les séquences en acides aminés et nucléotides de ce polypeptide pour le sous-groupe A sont représentées sur la seq id n° 3 (G2AδCys).

- Pour le sous-groupe B, les séquences en acides aminés et en nucléotides sont représentées sur la seq id n° 4 (G2BδCys).

Les séquences peptidiques seront notées G2AδCys et G2BδCys.

- Selon un autre aspect, l'invention a pour objet un polypeptide utile pour la préparation d'immunogène, caractérisé en ce qu'il consiste en la séquence peptidique comprise entre les résidus aminoacides numérotés 174 et 187 de la protéine G du VRS ou une séquence présentant au moins 80% d'homologie avec ladite séquence peptidique.

Dans cette dernière séquence le peptide 174-187 sous-groupe A peut présenter la séquence :

Seq id n° 5 :

- Ser Ile Cys Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys.

Le peptide 174-187 sous-groupe B peut présenter la séquence :

Seq id n° 6 :

Ser-Ile-Cys-Gly-Asn-Asn-Gln-Leu-Cys-Lys-Ser-Ile-Cys-Lys.

Le résidu Cys en position 186 peut également être remplacé par un résidu sérine, de manière à obtenir la séquence suivante :

Seq id n° 7 pour le sous-groupe A :

5 Ser Ile Cys Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Ser Lys.

Seq id n° 8 pour le sous-groupe B :

Ser-Ile-Cys-Gly-Asn-Asn-Gln-Leu-Cys-Lys-Ser-Ile-Ser-Lys.

10 Dans la séquence comprise entre les résidus 174 et 187 du peptide immunogène, selon l'une des variantes de l'invention, les résidus aminoacides en positions 176 et 182 sont respectivement remplacés par un acide aspartique et une ornithine, de manière à obtenir l'une des séquences suivantes :

Seq id n° 9 pour le sous-groupe A :

Ser Ile Asp Ser Asn Asn Pro Thr Orn Trp Ala Ile Cys Lys

15 Seq id n° 10 pour le sous-groupe B

Ser-Ile-Asp-Gly-Asn-Asn-Gln-Leu-Orn-Lys-Ser-Ile-Cys-Lys.

Seq id n° 11 pour le sous-groupe A :

Ser Ile Asp Ser Asn Asn Pro Thr Orn Trp Ala Ile Ser Lys.

Seq id n° 12 pour le sous-groupe B :

20 Ser-Ile-Asp-Gly-Asn-Asn-Gln-Leu-Orn-Ser-Ile-Ser-Lys.

Le maintien des propriétés immunogènes est obtenu grâce au remplacement du pont disulfure (entre les Cys naturelles) par un pont amide entre les positions 176 et 182.

25 L'invention a également pour objet un polypeptide utilisable comme agent immunogène présentant l'une des séquences précédentes et qui comporte en outre au moins un résidu cystéine en position N-terminale ou C- terminale.

30 L'invention comprend également un polypeptide qui consiste en la séquence peptidique comprise entre les résidus aminoacides numérotés 130 et 230 de la séquence de la protéine G du VRS sous-groupe A et sous-groupe B, ou en une séquence présentant 80% d'homologie avec ladite séquence peptidique et qui est sous forme d'une protéine de fusion avec le récepteur de la serumalbumine humaine, nommée BBG2A&C ou BBG2B&C, ou une autre protéine de liaison.

L'invention comprend également les variants par exemple glycosylés ou sulfatés des différents peptides, que ces fonctions soient naturelles ou non.

5 Les polypeptides peuvent être préparés par synthèse peptidique ou par les techniques d'ADN recombinant, qui sont connues de l'homme du métier.

10 En particulier, les séquences du gène codant pour l'épitope d'environ 100 acides aminés peuvent être préparées par assemblage de gènes en phase solide, et la protéine correspondante exprimée par exemple dans *E. coli* par voie intracellulaire.

Les séquences nucléotidiques (ARN ou ADN) codant pour les protéines ou les polypeptides définis ci-dessus font partie de l'invention.

15 Un autre objet de l'invention est un agent immunogène qui comporte un polypeptide tel que défini précédemment couplé à une protéine porteuse, en particulier à une protéine adjuvante d'immunité.

De préférence, le polypeptide selon l'invention est couplé à une protéine porteuse de type OmpA de la membrane externe d'une bactérie du genre *Klebsiella*, de préférence sous forme d'un conjugué soluble.

20 La Demanderesse a pu montrer qu'alors que les variants de la séquence 174-187 de la protéine G du VRS ne sont pas immunogènes, leur couplage avec une telle protéine induit une réponse immunitaire spécifique.

25 L'intensité de la réponse immunitaire a été comparée avec celle obtenue avec des adjuvants classiques, tel que le couplage au porteur KLH (keyhole limpet hemocyanin) coadministré avec l'adjuvant de Freund, ou le couplage à la protéine porteuse TT (tetanus toxoid).

30 Des résultats particulièrement avantageux sont obtenus pour des compositions contenant un polypeptide immunogène selon l'invention couplé à la protéine p40 de *Klebsiella pneumoniae* ou une protéine présentant 80% d'homologie avec la protéine p40.

Plus particulièrement, ledit polypeptide est couplé à une protéine comportant la séquence peptidique notée Seq id n° 13.

La séquence nucléotidique (ADN ou ARN) codant pour la protéine comportant la séquence id n° 13 est comprise dans l'invention.

35 Le polypeptide immunogène peut être couplé à la protéine adjuvante d'immunité par des méthodes connues de l'homme du métier telles que :

- Glutaraldéhyde
- Carbodiimide (ex : EDC : 1-(3diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide).
- Bis imido esters (ex : diméthyladipimide).
- N-hydroxysuccinimidyl esters (ex : disuccinimidyl subérate).
- 5 - Pour les peptides comportant une cystéine supplémentaire en position N terminale ou C terminale :
 - * Maléimido-N-hydroxysuccinimide esters (ex : MBS : maléimido benzoyl-N-hydroxy-succinimide ester).
 - * N- succinimidyl Bromoacétate.

10 Le polypeptide peut être conjugué à la protéine porteuse par une protéine de liaison, par exemple le récepteur de la sérumalbumine humaine (BB).

Selon un autre aspect, l'invention a également pour objet un procédé de préparation d'un peptide conjugué entrant dans une
15 composition utile pour prévention ou traitement des affections à VRS, caractérisé en ce que :

- a) on précipite les lipopolysaccharides de membranes de bactéries du genre Klebsiella, en présence d'un sel de cation divalent et de détergents, pour récupérer les protéines membranaires totales dans
20 le surnageant,
- b) on soumet les protéines à une chromatographie par échange d'anions pour séparer la fraction contenant la protéine adjuvante d'immunité,
- c) on concentre la fraction contenant la protéine adjuvante
25 d'immunité,
- d) on conjugue la protéine adjuvante d'immunité avec un polypeptide immunogène tel que définis ci-dessus pour former un conjugué soluble.

Le sel de cation divalent utilisé dans l'étape a) est de préférence un
30 sel de calcium ou de magnésium. Après centrifugation, les protéines du surnageant peuvent être récupérées avec un bon rendement par deux précipitations à l'éthanol.

Les protéines membranaires, après remise en suspension, sont séparées sur une colonne échangeuse d'anions, utilisable en conditions
35 industrielles. Ce support chromatographique est très stable et compatible avec les traitements de dépyrogénéation drastiques, ce qui n'était pas le cas des supports chromatographiques déjà décrits. D'autre part, l'élution de la

protéine peut être réalisée en conditions isocratiques et non par application d'un gradient de NaCl (comme décrit précédemment), ce qui est particulièrement avantageux en conditions industrielles.

5 Selon un autre aspect, l'invention a pour objet une composition utile pour la prévention et/ou le traitement des affections provoquées par le VRS, caractérisée en ce qu'elle contient un polypeptide caractérisé ci-avant.

10 Plus particulièrement les compositions contiennent en outre des excipients pharmaceutiquement acceptables adaptés à l'administration par voie injectable.

En effet, la Demanderesse a mis en évidence que l'injection de telles compositions entraîne une protection, non par un effet neutralisant, mais par une réponse immunitaire systémique de l'organisme.

15 Les réponses humorales et cellulaire (IgM, IgG, IgA et cellules T) sont provoquées par le produit qui induit également une protection à long terme et une mémoire immunologique contre les VRS sous groupes a et b.

En vue de l'administration des compositions vaccinales par voie sous-cutanée, il est souhaitable de disposer de conjugué soluble, ce qui est difficile par les méthodes conventionnelles.

20 C'est pourquoi l'invention concerne également un procédé de préparation d'un conjugué entre un peptide immunogène et une protéine de membrane de Klebsiella, en particulier la protéine p40 de K. pneumoniae, dans lequel le couplage est effectué en présence de glutaraldéhyde à des concentrations inférieures ou égales à 0,05%.

25 Ce procédé de couplage diminue considérablement les concentrations en glutaraldéhyde en comparaison de celles habituellement utilisées (2 fois 0,01% au lieu de 1% environ) ; le glutaraldéhyde est ajouté en 2 fois sur une période de cinq jours alors que les protocoles décrits mentionnent des temps de 24 heures.

30 Ces modifications ont permis l'obtention d'un conjugué soluble, sous une forme adaptée à l'administration sous cutanée.

35 Les protocoles usuels (concentrations en glutaraldéhyde plus élevées et temps courts) se traduisent par la formation d'un gel dense (dû à des réactions de conjugaison P40-P40, très probablement), forme impropre à l'administration et à la manipulation en général.

Le peptide conjugué peut être congelé et utilisé tel quel ou lyophilisé.

Les exemples qui suivent sont destinés à illustrer l'invention sans aucunement en limiter la portée.

5 Dans ces exemples on se référera aux figures suivantes :

- Figure 1 : intensité de la réponse immunitaire induite contre G1A sous différentes formes,
- Figure 2 : Cinétique de la réponse immunitaire induite contre G1A
10 présentée sous différentes formes,
- Figure 3 : Cinétique de la réponse immunitaire induite contre le porteur seul.

Exemple 1 : Synthèse et Purification du G₁A

15

Le polypeptide de séquence

Ser-Ile-Cys-Ser-Asn-Asn-Pro-Thr-Cys-Trp-Ala-Ile-Ser-Lys

| _____ ss _____ |

20

noté G₁A, est préparé par synthèse en phase solide en utilisant la chimie Boc.

Assemblage

25 L'assemblage du peptide est effectué par synthèse peptidique en phase solide sur polystyrène (divinylbenzène 1%), en commençant avec un agent de liaison Boc-Lys(2-cl-Z)-phénylacétamidométhyl.

On a utilisé la stratégie chimique Boc-Benzyle avec la procédure de déprotection-couplage suivante :

- | | | | |
|----|----|-------------------|--------------|
| 30 | 1. | 55 % TFA dans DCM | (1 x 5 min) |
| | 2. | 55 % TFA dans DCM | (1 x 25 min) |
| | 3. | DCM | (2 x 1 min) |
| | 4. | Isopropylalcool | (1 x 1 min) |
| | 5. | DMF | (2 x 1 min) |
| 35 | 6. | 10 % DIEA en DMF | (2 x 2 min) |
| | 7. | Couplage | |

8. DMF (2 x 1 min)
9. DCM (2 x 1 min)

A chaque étape on utilise 20 ml de solvant par gramme de peptide-résine.

- 5 Le couplage est effectué dans du DMF avec un ester hydroxybenzotriazole préformé pendant 30 min. On vérifie à chaque étape du couplage, si des fonctions aminé libres résiduelles sont présentes, par le test à la ninhydrine. Si nécessaire, un double couplage est effectué.

- Pour la synthèse du peptide G₁A, on a utilisé les groupes de protection de la chaîne latérale suivants :
- 10
- 2-chlorobenzoyloxycarbonyl pour la Lysine,
 - Benzyl pour la Sérine et la Thréonine,
 - 4-méthylbenzyl pour la Cystéine,
 - Formyl pour le Tryptophane.

- 15 Avant l'étape finale de déprotection/cleavage, le groupe formyl est éliminé par traitement 30 min par une solution de piperidine à 25 % dans du DMF. La résine peptidique est lavée par du DCM et de l'éther, et séchée sous pression réduite.

20 Clivage

- Le peptide est clivé de la résine et complètement déprotégé par un traitement au Fluorure d'Hydrogène liquide. 10 ml de Fluorure d'Hydrogène par gramme de peptide-résine sont utilisés classiquement à
- 25 0°C pendant 45 min en présence de p-cresol et d'éthanedithiol comme piège. Après évaporation du Fluorure d'Hydrogène, le mélange de réaction brut est lavé à l'éther, dissout dans du TFA, précipité à l'éther et séché.

Cyclisation et purification

30

Conditions générales de purification par HPLC :

Phase stationnaire : silice en C₁₈, 15-25 μ m, 100 Å

Phase mobile : solvant A : eau 0,1 % TFA

solvant B : acétonitrile/A, 60/40% (v/v)

- Gradient linéaire : 20 à 50 % B en 30 min (première étape de purification)
 15 à 40 % B en 30 min (seconde étape de purification)
- 5 Vitesse du flux : 40 ml/min
- Détection : UV (210 nm)

Le peptide brut obtenu après clivage est purifié dans les conditions décrites ci-dessus (gradient de 20 à 50 % B). Les fractions ayant une pureté supérieure à 70-80 % (HPLC) sont réunies et lyophilisées. Le peptide est ensuite purifié dans un mélange acétonitrile eau et DMSO (1mg/ml) et laissé sous agitation jusqu'à ce que la cyclisation soit complète (4 à 6 jours). L'évolution de la réaction est contrôlée par HPLC. Le mélange de réaction est finalement concentré sur la colonne d'HPLC préparative et un gradient de 15 à 40 % de B est appliqué en 30 min afin de purifier le peptide.

Généralement, après lyophilisation, une seconde purification dans les mêmes conditions, est effectuée pour atteindre le degré de pureté requis.

La pureté et l'identité du produit final sont contrôlées par HPLC analytique, analyse des amino acides et analyse de masse FAB.

Dans le peptide ainsi obtenu, le résidu sérine en treizième position remplace le résidu Cys du peptide naturel, évitant ainsi une hétérogénéité dans la formation des ponts disulfures, pouvant être nuisible à l'immunogénicité.

Exemple 2 : Préparation de l'épitope G₂AδCys

Construction de gène : matériels et méthodes

Dans un microtube Eppendorf, on rince 300 µg de billes avec du tampon washing/binding (1M NaCl, 10mM Tris-HCl pH7,5, 1 mM EDTA) avant d'ajouter 0,2 pmole de l'oligo biotinylé, 15 minutes d'incubation à température ambiante pour le binding. Les billes avec l'oligo fixé sont rincées et sédimentées. 0,2 pmole de l'oligo phosphorylé en 5' suivant est ajouté dans 60 µl de tampon hybridation/ligation (50mM Tris-HCl pH7,6, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 1mM 1,4-dithiothreitol [DTT], 5% polyéthylène glycol

[PEG] 8000). Le mélange d'hybridation est incubé à 70° C pendant 5 mn et laissé revenir à 37° C avant d'ajouter 3 unités de T4 DNA ligase (BRL) suivi de 15 mn d'incubation à 37° C. Le mélange réactionnel est rincé avant d'ajouter 0,2 pmole d'oligo suivant. La procédure d'hybridation/ligation est répétée autant de fois qu'on ajoute un nouveau oligo complémentaire phosphorylé en 5'. A la fin, le duplex d'ADN fixé sur billes magnétiques peut être séparé du support en coupant avec les enzymes de restriction appropriées.

On prépare l'ADN correspondant à la séquence G2AδCys et à la séquence G2AδCys liée à la protéine de liaison à la serumalbumine humaine(BB) notée BB-G2AδCys.

La séquence nucléotidique est exprimée chez *E. coli* pour récupérer les protéines correspondantes.

Vecteur d'expression :

pVABBG2AδC est un vecteur d'expression de type intracellulaire, il contient un promoteur d'origine *E. coli*, l'opération tryptophane (Trp), suivi du gène codant pour le récepteur de la serum albumine humaine BB (P-Å Nygrén et col, J. Mol. Recognit., 1988, 1, 60) et enfin le gène codant pour G2AδC du VRS. L'expression du gène hétérologue peut être induite en présence de l'IAA (acide-3-β-indolacrylique). Le produit de fusion BBG2AδC peut être purifié par affinité sur colonne HSA-sépharose, après avoir libéré les protéines cytoplasmiques de *E. coli*.

Exemples de purification de protéines à partir de culture de 500 ml :

La souche *E. coli* RV 308 (Maurer et col., J. Mol. Biol., 1980, 139, 147) transfectée par le plasmide pVABBG2AδC, a été sélectionnée sur gélose renfermant de l'ampicilline (100µg/ml) et de la tétracycline (8µg/ml). On inocule la souche dans un Erlenmeyer contenant 100 ml de milieu de culture TSB (Tryptic Soy broth, Difco) (30g/l), supplémenté avec de la levure (Yeast Extract, Difco) (5 g/l), de l'Ampicilline (100 µg/ml), de la tétracycline (8 µg/ml) et du Tryptophane (100 µg/ml). Incuber à 32°C pendant 12 heures sous agitation (190 rpm). Transvaser la culture dans un autre erlenmeyer (5 litres) contenant quatre fois le volume initial (400 ml TSB + levure + les mêmes antibiotiques à la même concentration). Lorsque la densité optique du milieu (à 550 nm) atteint environ une D.O. de 1,5, on induit la production des protéines en ajoutant dans le milieu de l'IAA à la concentration finale de 25 µg/ml. On arrête la culture après 5 heures

d'incubation, sous agitation (190 rpm) à 32°C. Après centrifugation, le culot bactérien est resuspendu dans un récipient contenant environ 60 ml de solution de TST (50 mM TrisHCl, pH 8,0, 200mM NaCl, 0,05 % Tween 20, 0,5 mM EDTA) à froid.

5 On introduit dans le récipient une sonde standard de sonicateur (VIBRA-CELL, Somics Mat, USA). On fait la sonication à la puissance 5 pendant deux minutes environ. Le surnageant de solution après centrifugation est filtré à 0,45 μ m, et passé dans une colonne contenant environ 3 ml de gel de HSA-sépharose (STAHL et col, J. Immunol. Meth., 1989, 124, 43).

10 Les protéines purifiées sont analysées par SDS-PAGE sur l'appareil Phast System (PHARMACIA) ou sur Mini Protean BIORAD. Les gels sont révélés par le bleu de Coomassie. La protéine BBG2A8C, représentant plus de 90 % de pureté, correspond bien à la taille attendue (39,3 Kda) par rapport aux standards de poids moléculaires connus.

15 L'immunotransfert de cette protéine sur membrane Problott (ABI) permet de l'identifier avec des anticorps spécifiques, anti-BB et/ou anti-protéine G du VRS (ss-groupe A). Le rendement de protéines solubles purifiées à partir du cytoplasme de *E. coli* est environ 50 mg/litre de culture.

20 En fermenteur de 2 litres, on peut obtenir de 500 à 800 mg de protéines BBG2A8C par litre de culture, dans les conditions optimales de culture.

25 Exemple 3 : Procédé de purification de p40

La biomasse de *Klebsiella pneumoniae* (40 g de cellules sèches dans un volume de 500 ml, souche IP I 145) est ajustée à pH 2,5 à l'aide d'acide acétique pur.

30 Après addition d'un demi volume de solution de cétrimide 6%, éthanol 60%, CaCl₂ 1,5 M ajusté à pH 2,5 avec de l'acide acétique, le mélange est agité 16 heures à température ambiante.

Après centrifugation 20 min à 15 000 g à 4° C, les protéines du surnageant sont précipitées à l'éthanol (50 % final).

35 Après centrifugation 10 mn à 10 000 g à 4°C, les protéines du surnageant sont précipitées en amenant la concentration à 80 %.

Après centrifugation 10 min à 10 000 g à 4° C, les culots sont remis en suspension dans une solution de zwittergent 3-14, 1%.

Après agitation 4 h à température ambiante, le pH est ajusté à 6,5 à l'aide de NaOH 1 N.

- 5 Après centrifugation 20 min à 10 000 g à 4° C, le surnageant est stocké à -20° C avant purification (solution MP). 0,8 à 1,2 g de protéines sont ainsi récupérées.

- 10 1 g de protéines de la solution de MP sont dialysées dans un tampon Tris/HCl 20 mM pH 8,0 : zwittergent 3-14, 0,1 %. Le dialysat est déposé sur une colonne (50 mm x 250 mm) contenant un support de type échangeur d'anions forts, gel Biorad Macrorep High Q, équilibrée dans le tampon décrit ci-dessus. p40 est éluée à une concentration de 0,1 M à 0,3 M en NaCl dans le tampon d'équilibration. Les fractions sont analysées par SDS-PAGE en utilisant le système automatique Phast-système Pharmacia.
- 15 Les fractions contenant p40 sont rassemblées et concentrées par ultrafiltration en utilisant des unités de filtration Millipore Minitan possédant un seuil de coupure de 10 kDa. 300 à 500 mg de protéine P40 pure sont ainsi récupérés.

- 20 Les quantités de protéines sont mesurées par la méthode de LOWRY. La pureté et l'homogénéité de la protéine P40 sont estimées par SDS-PAGE suivant une modification de la méthode de Laemmli (Laemmli U.K., Nature (1970) 227 : 680) ainsi que par spectrométrie de masse suivant la technique d'ionisation par électrospray.

25 Exemple 4 : clonage et séquençage du gene de p40

Après séquençage par la méthode d'Edman de fragments N terminaux et internes de la protéine p40, des fragments de séquence protéique ont été déterminés.

- 30 Des oligonucléotides correspondant à des fragments de séquence des gènes d'OmpA ont été synthétisés et utilisés comme amorces pour le clonage du gène de p40 par la technique de PCR.

La séquence du gène de p40 (OmpA de *Klebsiella pneumoniae*) est représentée par la séquence id n° 13.

- 35 L'analyse de p40 permet de déterminer qu'il s'agit d'une protéine de 355 aminoacides, de poids moléculaire 36064. Les teneurs en aminoacides sont les suivantes :

| | | |
|-----------------------|--------------------|--------------------|
| Gly : 42 (12,50 %); | Ala : 33 (9,82 %); | Ser : 17 (5,06 %); |
| Thr : 20 (5,95 %); | Val : 27 (8,04 %); | Leu : 22 (6,55 %); |
| Ile : 9 (2,68 %); | Pro : 17 (5,06 %); | Cys : 2 (0,60 %); |
| Met : 6 (1,79 %); | His : 3 (0,89 %); | Tyr : 17 (5,06 %); |
| 5 Asp : 23 (6,85 %); | Glu : 13 (3,87 %); | Lys : 17 (5,06 %); |
| Arg : 15 (4,46 %); | Asn : 19 (5,65 %); | Gln : 17 (5,06 %); |
| Phe : 10 (2,98 %); | Trp : 6 (1,79 %); | TER : 0 (0,30 %); |

Exemple 5 : couplage de la protéine p40 au peptide G₁A

10

p40 (5 mg/ml, 40 mg) est dialysée contre 300 volumes de tampon phosphate de sodium 0,1 M pH 7, zwittergent 3-14, 0,1%.

15

Le dialysat est ajusté à une concentration de 2 mg/ml à l'aide d'un tampon carbonate 0,1 M pH 9 ; zwittergent 3-14, 0,1%. Du sodium dodécyl sulfate (SDS) est ajouté pour atteindre une concentration finale de 4%.

Le peptide G₁ (10 mg/10 ml de tampon carbonate 0,1 M pH 9 ; zwittergent 3-14 0,1 %) est ajouté à la solution de p40. La valeur du pH est contrôlée (comprise entre pH 9 et pH 10).

20

Ajouter 220 µl de glutaraldéhyde (2,5% dans l'eau), agiter 24 heures à 4° C.

Ajouter 5 ml de tampon carbonate 0,1 M pH 9 ; zwittergent 3-14 0,1%; vérifier le pH (compris entre pH 9 et pH 10) ; agiter 72 heures à 4° C.

Ajouter 220 µl de glutaraldéhyde (2,5% dans l'eau), vérifier le pH, agiter 24 heures à + 4° C.

25

La réaction est stoppée par addition de 100 µl de lysine 1 M. La solution est dialysée 24 heures à 4° C.

Le SDS est éliminé par double précipitation au KCl.

La solution contenant le conjugué p40 est congelée et utilisée telle quelle ou lyophilisée.

30

Exemple 6 : activité

Matériel et méthodes

35

Les souris C57BL/6 (N=5) sont immunisées à JO, J10, J20 par voie sous cutanée avec 10 µg de G₁, couplé ou non à un porteur, en présence ou non

d'un adjuvant. Le sérum est collecté et testé par ELISA. Les Ig anti-G1 ou anti-porteur sont isolées sur support BSA-G1 et sur support "porteur" (KLH ou TT ou P40). Les Ig sont révélées à l'aide d'un conjugué anti-Ig lapin peroxydase. La densité optique est lue à 450 nm et le titre en anticorps anti-G1 est donné par l'inverse de la dernière dilution donnant deux fois le bruit de fond. Les résultats représentent la moyenne \pm écart-type des titres des 5 souris.

RESULTATS

10

Induction d'une réponse immunitaire contre G1A

Les souris sont immunisées avec G1A sous différentes formes selon un schéma d'immunisation identique. Les réponses anticorps induites par les différentes formes de G1A sont comparées 28 jours après le début de l'expérience.

Le peptide synthétique G1A administré pur n'induit pas de réponse immunitaire même s'il est coadministré avec l'adjuvant de Freund. Présenté par le porteur KLH, G1A induit une réponse faible qui est significativement augmentée par la coadministration de l'adjuvant de Freund (AF). Présenté par p40, G1A induit une réponse supérieure à celle obtenue dans le schéma d'immunisation classique KLH/G1+AF, p40 à des propriétés de "self-adjuvant carrier".

Les résultats sont présentés sur la figure 1.

25

Cinétique de la réponse immunitaire contre G1A

Les souris sont immunisées avec G1A sous différentes formes selon un schéma d'immunisation identique. Les réponses anticorps induites par les différentes formes de G1A sont comparées dans le temps : 7, 17, 28, 35, 42 jours après le début de l'expérience.

La réponse anti-G1A est significativement plus élevée et plus rapide lorsque les souris sont immunisées avec p40/G1A que les immunisations plus classiques TT/G1A et KLH/G1A+AF. Une seule injection de p40/G1A permet d'obtenir, en 7 jours, un titre d'anticorps anti-G1A de 1000. Ce titre est obtenu avec TT/G1A ou KLH/G1A+AF en 28 jours. La réponse maximum (titre = 1/380 000), obtenue après trois injections, en 28 jours, est environ

30 fois supérieure à celle obtenue avec KLH/G1A+AF et 70 fois supérieure à celle obtenue avec TT/G1A. Le titre en anticorps anti-G1A se maintient sans faiblir jusqu'au jour 42.

Les résultats sont présentés sur la figure 2.

5

Cinétique de la réponse immunitaire contre le porteur

Les souris sont immunisées avec G1A couplé à un porteur selon un schéma d'immunisation identique. Les réponses anticorps induites par les différents porteurs sont comparées dans le temps, 7, 17, 28, 35, 42 jours après le début de l'expérience.

10

La réponse anti-p40 (titre voisin du 10 000) est supérieure à la réponse anti-KLH mais non significativement différente de la réponse anti-TT.

15

Les résultats sont présentés sur la figure 3.

CONCLUSION

Le couplage chimique du peptide G1A sur la protéine p40 a permis d'induire une réponse anti-G1A significativement plus importante et plus rapide que celles provoquées par les modèles de référence KLH/G1A+AF ou TT/G1A. Le couplage du peptide G1B devrait induire des réponses similaires.

20

Exemple 7 : Evaluation du potentiel protecteur des peptides et des protéines recombinantes de la glycoprotéine G du virus respiratoire syncytial (VRS) sous- groupe A couplés à la protéine porteuse p40

30

Les souris BALB/c ont été immunisées avec les différentes préparations suivantes :

- 1) peptide de synthèse G1A couplé à KLH (keyhole limpet hemocyanin) = KLH.G1A.
- 2) peptide de synthèse G1A couplé à la protéine porteuse p40 = p40.G1A.
- 3) témoin p40 seul.

35

- 4) protéine recombinante produite dans E. coli : BBG2A&C couplée à la protéine porteuse p40 = p40.BBG2A&C.
- 5) peptide de synthèse G1A couplé à la protéine porteuse toxine tétanique (TT) = TT.G1A.
- 5 6) témoin TT seul.
- 7) témoin BB seul.
- 8) témoin VRS long (sous-groupe A).

10 Les souris ont reçu 3 doses intramusculaires (200 µg/souris) avec l'hydroxyde d'aluminium comme adjuvant (utilisé couramment chez l'homme). Les résultats des tests de protection ainsi que du profil immunologique des sérums se trouvent dans le tableau 1.

15 Les préparations suivantes confèrent une protection complète suite au challenge avec le VRS Long (Souche A) : p40.G1A, p40.BBG2A&C, par rapport à TT.G1A qui confère aussi une très bonne protection comparable au peptide KLH.G1A. En test ELISA, tous reconnaissent l'antigène VRS avec un titre le plus fort pour p40.G1A=1/12800.

Quant au test de neutralisation, aucune des préparations ne possède d'activité neutralisante in vitro.

| Peptides et Protéines Recombinantes | Protection | | | | Titre Elisa versus VRS long | Neutra- lisation log 2/25 µl |
|--|--|------|-------------|------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| | DICT50 log10/g poumons challenge avec VRS long (1,5.10 ⁵ /souris) (Sous-Groupe A) | | | | | |
| | 5 - 6 jours | | 7 - 8 jours | | | |
| | | | | | | |
| KLH.G1A (100 à 157 µg) | 2,45 | 2,45 | 2,45 | ≤ 2,0 ± 0,4 p<0,001 | 4000 | < 3,0 |
| | 2,45 | 2,15 | 2,15 | ≤ 2,0 ± 0,4 p<0,001 | | |
| | <1,7 | <1,7 | <1,7 | <1,7 | | |
| | <1,7 | <1,7 | <1,7 | <1,7 | | |
| | <1,7 | <1,7 | <1,7 | <1,7 | | |
| P40 . G1A (200 µg) | <1,7 | <1,7 | <1,7 | <1,7 ± 0 p<0,001 | 12 800 | < 3,0 |
| | <1,7 | <1,7 | <1,7 | <1,7 | | |
| | <1,7 | <1,7 | <1,7 | <1,7 | | |
| | <1,7 | <1,7 | <1,7 | <1,7 | | |
| | <1,7 | <1,7 | <1,7 | <1,7 | | |
| Témoins P40 (200 µg) | 4,7 | 4,7 | 4,7 | 4,5 ± 0,1 p<0,001 | 300 | < 3,0 |
| | 4,45 | 4,45 | 4,45 | 4,5 ± 0,1 p<0,001 | | |
| | 4,45 | 4,45 | 4,45 | 4,5 ± 0,1 p<0,001 | | |
| | 4,45 | 4,45 | 4,45 | 4,5 ± 0,1 p<0,001 | | |
| | <1,7 | <1,7 | <1,7 | <1,7 | | |
| P40. BBG2A6C (200 µg) | <1,7 | <1,7 | <1,7 | <1,7 ± 0 p<0,001 | 1700 | < 3,0 |
| | <1,7 | <1,7 | <1,7 | <1,7 | | |
| | <1,7 | <1,7 | <1,7 | <1,7 | | |
| | <1,7 | <1,7 | <1,7 | <1,7 | | |
| | <1,7 | <1,7 | <1,7 | <1,7 | | |

Tableau 1 : Protection conférée et profil immunologique des sérums après challenge avec VRS Long (A) suite à l'immunisation de souris BALB/c avec différentes protéines recombinantes. (3-4 semaines après 3 doses i.m. avec hydroxide d'Aluminium)

| Peptides et Protéines Recombinantes | Protection | | | | | Titre Elisa versus VRS long | Neutra- lisation log 2/25 µl |
|--|---|------------|-------------|--|------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| | DICT50 log10/g poumons challenge avec VRS long (1,5.10 ⁵ /souris) | | | | | | |
| | (Sous-Groupe A) | | | | | | |
| | 5 - 6 jours | | 7 - 8 jours | | | | |
| TT.G1A (200 µg) | <1,7 | | <1,7 | | | | |
| | <1,7 | <1,9 ± 0,3 | <1,7 | | <1,9 ± 0,3 | | |
| | <1,7 | p < 0,001 | <1,7 | | p < 0,001 | | < 3,0 |
| | <1,7 | | <1,7 | | | | |
| | 2,45 | | 2,45 | | | | |
| TT Témoins (200 µg) | 4,45 | | 4,7 | | | | |
| | 4,2 | 4,2 ± 0,3 | 4,2 | | 4,2 ± 0,4 | | |
| | 4,2 | p=0,022 | 4,2 | | p=0,053 | | < 3,0 |
| | 4,45 | | 4,45 | | | 250 | |
| | 3,7 | | 3,7 | | | | |
| Témoins BB (200 µg) | 2,95 | | 2,95 | | | | |
| | 4,2 | 3,7 ± 0,5 | 4,2 | | 3,8 ± 0,5 | | < 3,0 |
| | 3,95 | p=0,853 | 4,2 | | p=0,760 | | |
| | 3,7 | | 3,7 | | | 150 | |
| | 3,7 | | 3,7 | | | | |

Tableau 1 (suite) : Protection conférée et profil immunologique des sérum après challenge avec VRS Long (A) suite à l'immunisation de souris BALB/c avec différentes protéines recombinantes. (3-4 semaines après 3 doses l.m. avec hydroxide d'Aluminium)

| Peptides et Protéines Recombinantes | Protection | | | Titre Elisa versus VRS long | Neutra- lisation log 2/25 µl |
|--|--|---------------------|---|-----------------------------------|------------------------------------|
| | DICT50 log10/g poumons challenge avec VRS long (1,5.10 ⁵ /souris) (Sous-Groupe A) | | | | |
| | 5 - 6 jours | | 7 - 8 jours | | |
| | | | | | |
| Témoins VRS long | <1,7 <1,7 <1,7 <1,7 <1,7 | <1,7 ± 0 p=0,001 | <1,7 <1,7 <1,7 <1,7 <1,7 | <1,7 ± 0 p=0,001 | 76 800 6,6 |
| Témoins, non immunisés, challengeés | 3,95 3,95 3,7 3,45 3,95 3,45 | 3,7 ± 0,2 | 3,95 4,2 3,7 3,45 3,95 3,7 | 3,8 ± 0,3 150 | < 3,0 |
| Témoins, non immunisés, non challengeés | Pas de virus | | Pas de virus | | 150 < 3,0 |

Tableau 1 (suite) :

Protection conférée et profil immunologique des sérums après challenge avec VRS Long (A) suite à l'immunisation de souris BALB/c avec différentes protéines recombinantes. (3-4 semaines après 3 doses i.m. avec hydroxyde d'Aluminium)

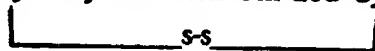
Exemple 8

Evaluation du potentiel protecteur des peptides de la glycoprotéine G du virus respiratoire syncytial (VRS) sous-groupe A et sous-groupe B couplés à la KLH. Protection vis-à-vis d'un challenge réalisé avec les deux sous-groupes du VRS.

Les souris BALB/c ont été immunisées avec les différentes préparations suivantes :

1. peptide de synthèse C1A couplé à la KLH (keyhole limpet hemocyanin) = KLH-G1A
2. peptide de synthèse G1B couplé à la KLH (keyhole limpet hemocyanin) = KLH-G1B. Le peptide G1B correspond à la séquence G (174-187)δCys du sous-groupe B dont la séquence est :

Ser-Ile-Cys-Gly-Asn-Asn-Gln-Leu-Cys-Lys-Ser-Ile-Ser-Lys



15

3. Témoin KLH
4. Témoin VRS long (sous-groupe A)
5. Témoin VRS 8/60 (sous-groupe B)

Les souris ont reçu 3 doses intramusculaires (200µg/souris) avec l'adjuvant de Freund. Les résultats des tests de protection ainsi que du profil immunologique des sérums se trouvent dans le tableau 2.

La préparation KLH-G1A permet une protection complète vis-à-vis du VRS sous-groupe A mais pas vis-à-vis du VRS sous-groupe B. Par contre, la préparation KLH-G1B permet une protection complète vis-à-vis du VRS sous-groupe B mais pas vis-à-vis du VRS sous-groupe A. Le test ELISA reflète la même situation.

35 30 25 20 15 10 5

| Peptides couplés à la KLH | PROTECTION | | | Titre ELISA | |
|------------------------------|---|--|--|------------------------|------------------------|
| | Challenge VRS long (sous-groupe A) $1,5 \times 10^5/s$ (50/ μ l) n = 11 $\leq 1,8 \pm 0,3$ p < 0,001 | Challenge VRS 8/60 (sous-groupe A) $0,6 \times 10^5/s$ (50/ μ l) n = 10 $3,3 \pm 0,5$ p = 0,237 | | Versus VRS long (A) | Versus VRS 8/60 (B) |
| GIA | | | | | |
| GIB | | | | | |
| Témoin KLH | | | | | |
| Témoin VRS (A) | | | | | |
| Témoin VRS (B) | | | | | |

Tableau 2 : Protection conférée et profil immunologique des sérums après challenge avec le RS long (sous-groupe A) ou avec le RS 8/60 (sous-groupe B) suite à l'immunisation de souris BALB/c avec les peptides GIA et GIB.

LISTE DE SEQUENCES

Information pour la SEQ ID NO:1

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides
 LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 101 acides aminés, 303 nucléotides
 NOMBRE DE BRINS : simple
 CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : protéine

130

N -Thr Val Lys Thr Lys Asn Thr Thr Thr Thr Gln Thr Gln
 5'-ACC GTG AAA ACC AAA AAC ACC ACG ACC ACC CAG ACC CAG

143

Pro Ser Lys Pro Thr Thr Lys Gln Arg Gln Asn Lys Pro Pro Asn Lys Pro Asn
 CCG AGC AAA CCG ACC ACC AAA CAG CGT CAG AAC AAA CCG CCG AAC AAA CCG AAC

161

Asn Asp Phe His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys Ser Asn
 AAC GAT TTC CAT TTC GAA GTG TTC AAC TTC GTG CCG TGC AGC ATC TGC AGC AAC

174

179

Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys Lys Pro Gly Lys
 AAC CCG ACC TGC TGG GCG ATC TGC AAA CGT ATC CCG AAC AAA AAA CCG GGC AAA

187

197

Lys Thr Thr Thr Lys Pro Thr Lys Lys Pro Thr Phe Lys Thr Thr Lys Lys Asp
 AAA ACC ACG ACC AAA CCG ACC AAA AAA CCG ACC TTC AAA ACC ACC AAA AAA GAT

215

His Lys Pro Gln Thr Thr Lys Pro Lys Glu Val Pro Thr Thr Lys Pro - C Ter
 CAT AAA CCG CAG ACC ACC AAA CCG AAA GAA GTG CCG ACC ACC AAA CCA - 3'

230

Information pour la SEQ ID NO:2

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides
 LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 101 acides aminés, 303 nucléotides
 NOMBRE DE BRINS : simple
 CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : Protéine

130

-Thr Ala Gln Thr Lys Gly Arg Ile Thr Thr Ser Thr Gln
 5' -ACC GCG CAG ACC AAA GGC CGT ATC ACC ACC AGC ACC CAG

24

143

Thr Asn Lys Pro Ser Thr Lys Ser Arg Ser Lys Asn Pro Pro Lys Lys Pro Lys
ACC AAC AAA CCG AGC ACC AAA AGC CGT AGC AAA AAC CCG CCG AAA AAA CCG AAA

161

Asp Asp Tyr His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys Gly Asn
GAT GAT TAC CAC TTC GAA GTG TTC AAC TTC GTG CCC TGC AGC ATC TGC GGC AAC

174

179

Asn Gln Leu Cys Lys Ser Ile Cys Lys Thr Ile Pro Ser Asn Lys Pro Lys Lys
AAC CAG CTG TGC AAA AGC ATC TGC AAA ACC ATC CCG AGC AAC AAA CCG AAA AAG

187

197

Lys Pro Thr Ile Lys Pro Thr Asn Lys Pro Thr Thr Lys Thr Thr Asn Lys Arg
AAA CCG ACC ATC AAA CCG ACC AAC AAA CCG ACC ACC AAA ACC ACC AAC AAA CGT

215

Asp Pro Lys Thr Pro Ala Lys Met Pro Lys Lys Glu Ile Ile Thr Asn - C Ter
GAT CCG AAA ACC CCG GCG AAA ATG CCG AAG AAG GAA ATC ATC ACC AAC - 3'

230

Information pour la SEQ ID N°3

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 101 acides aminés, 303 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : protéine

130

-Thr Val Lys Thr Lys Asn Thr Thr Thr Thr Gln Thr Gln
5'-ACC GTG AAA ACC AAA AAC ACC ACG ACC ACC CAG ACC CAG

143

Pro Ser Lys Pro Thr Thr Lys Gln Arg Gln Asn Lys Pro Pro Asn Lys Pro Asn
CCG AGC AAA CCG ACC ACC AAA CAG CGT CAG AAC AAA CCG CCG AAC AAA CCG AAC

161

Asn Asp Phe His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Ser Ser Ile Cys Ser Asn
AAC GAT TTC CAT TTC GAA GTG TTC AAC TTC GTG CCG AGC AGC ATC TGC AGC AAC

174

76

179

Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Ser Lys Arg Ile Pro Asn Lys Lys Pro Gly Lys
AAC CCG ACC TGC TGG GCG ATC AGC AAA CGT ATC CCG AAC AAA AAA CCG GGC AAA

187

197

Lys Thr Thr Thr Lys Pro Thr Lys Lys Pro Thr Phe Lys Thr Thr Lys Lys Asp
AAA ACC ACG ACC AAA CCG ACC AAA AAA CCG ACC TTC AA. ACC ACC AAA AAA GAT

25

215

230

His Lys Pro Gln Thr Thr Lys Pro Lys Glu Val Pro Thr Thr Lys Pro - C Ter
 CAT AAA CCG CAG ACC ACC AAA CCG AAA GAA GTG CCG ACC ACC AAA CCA - 3'

Information pour la SEQ ID NO:4

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 101 acides aminés, 303 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : protéine

130

N -Thr Ala Gln Thr Lys Gly Arg Ile Thr Thr Ser Thr Gln
 5'-ACC GCG CAG ACC AAA GGC CGT ATC ACC ACC AGC ACC CAG

143

Thr Asn Lys Pro Ser Thr Lys Ser Arg Ser Lys Asn Pro Pro Lys Lys Pro Lys
 ACC AAC AAA CCG AGC ACC AAA AGC CGT AGC AAA AAC CCG CCG AAA AAA CCG AAA

161

174

Asp Asp Tyr His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Ser Ser Ile Cys Gly Asn
 GAT GAT TAC CAC TTC GAA GTG TTC AAC TTC GTG CCC AGC AGC ATC TGC GGC AAC

179

187

Asn Gln Leu Cys Lys Ser Ile Ser Lys Thr Ile Pro Ser Asn Lys Pro Lys Lys
 AAC CAG CTG TGC AAA AGC ATC AGC AAA ACC ATC CCG AGC AAC AAA CCG AAA AAG

197

Lys Pro Thr Ile Lys Pro Thr Asn Lys Pro Thr Thr Lys Thr Thr Asn Lys Arg
 AAA CCG ACC ATC AAA CCG ACC AAC AAA CCG ACC ACC AAA ACC ACC AAC AAA CGT

215

230

Asp Pro Lys Thr Pro Ala Lys Met Pro Lys Lys Glu Ile Ile Thr Asn - C Ter
 GAT CCG AAA ACC CCG GCG AAA ATG CCG AAG AAG GAA ATC ATC ACC AAC - 3'

Information pour la SEQ ID NO:5

TYPE DE SEQUENCE : acide aminé

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 14 acides aminés

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : peptide

Ser Ile Cys Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys.

Information pour la SEQ ID N0:6

TYPE DE SEQUENCE : acide aminé
LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 14 acides aminés
NOMBRE DE BRINS : simple
CONFIGUARIONS : linéaire

TYPE DE MOLECULE : peptide

Ser Ile Cys Gly Asn Asn Gln Leu Cys Lys Ser Ile Cys Lys.

Information pour la SEQ ID N0:7

TYPE DE SEQUENCE : acide aminé
LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 14 acides aminés
NOMBRE DE BRINS : simple
CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : peptide

Ser Ile Cys Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Ser Lys.

Information pour la SEQ ID N0:8

TYPE DE SEQUENCE : acide aminé
LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 14 acides aminés
NOMBRE DE BRINS : simple
CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : peptide

Ser Ile Cys Gly Asn Asn Gln Leu Cys Lys Ser Ile Ser Lys.

Information pour la SEQ ID N0:9

TYPE DE SEQUENCE : acide aminé
LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 14 acides aminés
NOMBRE DE BRINS : simple
CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : peptide

Ser Ile Asp Ser Asn Asn Pro Thr Orn Trp Ala Ile Cys Lys.

Information pour la SEQ ID N0:10

TYPE DE SEQUENCE : acide aminé
LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 14 acides aminés
NOMBRE DE BRINS : simple
CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : peptide

Ser Ile Asp Gly Asn Asn Gln Leu Orn Lys Ser Ile Cys Lys.

Information pour la SEQ ID NO:11

TYPE DE SEQUENCE : acide aminé
 LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 14 acides aminés
 NOMBRE DE BRINS : simple
 CONFIGURATION : linéaire
 TYPE DE MOLECULE : peptide

Ser Ile Asp Ser Asn Asn Pro Thr Orn Trp Ala Ile Ser Lys.

Information pour la SEQ ID NO:12

TYPE DE SEQUENCE : acide aminé
 LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 14 acides aminés
 NOMBRE DE BRINS : simple
 CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : peptide

Ser Ile Asp Gly Asn Asn Gln Leu Orn Lys Ser Ile Ser Lys.

Information pour la SEQ ID NO:13

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et protéines
 LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 335 acides aminés, 1005 nucléotides
 NOMBRE DE BRINS : simple
 CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : protéine

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|
| P40 = | N-Ala | Pro | Lys | Asp | Asn | Thr | Trp | Tyr | Ala | Gly | Gly | Lys | Leu | Gly | Trp | Ser | 16 |
| | GCT | CCG | AAA | GAT | AAC | ACC | TGG | TAT | GCA | GGT | GGT | AAA | CTG | GGT | TGG | TCC | |
| | 9 | | | | 18 | | | 27 | | | 36 | | | 45 | | | 34 |
| | Gln | Tyr | His | Asp | Thr | Gly | Phe | Tyr | Gly | Asn | Gly | Phe | Gln | Asn | Asn | Asn | Gly |
| | CAG | TAT | CAC | GAC | ACC | GGT | TTC | TAC | GGT | AAC | GGT | TTC | CAG | AAC | AAC | AACT | CCG |
| | 57 | | | | 66 | | | 75 | | | 84 | | | 93 | | | 102 |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | 52 |
| | Thr | Arg | Asn | Asp | Gln | Leu | Gly | Ala | Gly | Ala | Phe | Gly | Gly | Tyr | Gln | Val | Asn |
| | ACC | CGT | AAC | GAT | CAG | CTT | GGT | GCT | GGT | GCG | TTC | GGT | GGT | TAC | CAG | GTT | AAC |
| | 111 | | | | 120 | | | 129 | | | 138 | | | 147 | | | 156 |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | 70 |
| | Tyr | Leu | Gly | Phe | Glu | Met | Gly | Tyr | Asp | Trp | Leu | Gly | Arg | Met | Ala | Tyr | Lys |
| | TAC | CTC | GGT | TTC | GAA | ATG | GGT | TAT | GAC | TGG | CTG | GGC | CGT | ATG | GCA | TAT | AAA |
| | 165 | | | | 174 | | | 183 | | | 192 | | | 201 | | | 210 |

88
 Ser Val Asp Asn Gly Ala Phe Lys Ala Gln Gly Val Gln Leu Thr Ala Lys Leu
 AGC GTT GAC AAC GGT GCT TTC AAA GCT CAG GGC GTT CAG CTG ACC GCT AAA CTG
 219 228 237 246 255 264

106
 Gly Tyr Pro Ile Thr Asp Asp Leu Asp Ile Tyr Thr Arg Leu Gly Gly Met Val
 GGT TAC CCG ATC ACT GAC GAT CTG GAC ATC TAC ACC CGT CTG GGC GGC ATG GTT
 273 282 291 300 309 318

124
 Trp Arg Ala Asp Ser Lys Gly Asn Tyr Ala Ser Thr Gly Val Ser Arg Ser Glu
 TGG CGC GCT GAC TCC AAA GGC AAC TAC GCT TCT ACC GGC GTT TCC CGT AGC GAA
 327 336 345 354 363 372

142
 His Asp Thr Gly Val Ser Pro Val Phe Ala Gly Gly Val Glu Trp Ala Val Thr
 CAC GAC ACT GGC GTT TCC CCA GTA TTT GCT GGC GGC GTA GAG TGG GCT GTT ACT
 381 390 399 408 417 426

160
 Arg Asp Ile Ala Thr Arg Leu Glu Tyr Gln Trp Val Asn Asn Ile Gly Asp Ala
 CGT GAC ATC GCT ACC CGT CTG GAA TAC CAG TGG GTT AAC AAC ATC GGC GAC GCG
 435 444 453 462 471 480

178
 Gly Thr Val Gly Thr Arg Pro Asp Asn Gly Met Leu Ser Leu Gly Val Ser Tyr
 GGC ACT GTG GGT ACC CGT CCT GAT AAC GGC ATG CTG AGC CTG GGC GTT TCC TAC
 489 498 507 516 525 534

196
 Arg Phe Gly Gln Glu Asp Ala Ala Pro Val Val Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala
 CGC TTC GGT CAG GAA GAT GCT GCA CCG GTT GTT GCT CCG GCT CCG GCT CCG GCT
 543 552 561 570 579 588

214
 Pro Glu Val Ala Thr Lys His Phe Thr Leu Lys Ser Asp Val Leu Phe Asn Phe
 CCG GAA GTG GCT ACC AAG CAC TTC ACC CTG AAG TCT GAC GTT CTG TTC AAC TTC
 597 606 615 624 633 642

232
 Asn Lys Ala Thr Leu Lys Pro Glu Gly Gln Gln Ala Leu Asp Gln Leu Tyr Thr
 AAC AAA GCT ACC CTG AAA CCG GAA GGT CAG CAG GCT CTG GAT CAG CTG TAC ACT
 651 660 669 678 687 696

250
 Gln Leu Ser Asn Met Asp Pro Lys Asp Gly Ser Ala Val Val Leu Gly Tyr Thr
 CAG CTG AGC AAC ATG GAT CCG AAA GAC GGT TCC GCT GTT GTT CTG GGC TAC ACC
 705 714 723 732 741 750

Asp Arg Ile Gly Ser Glu Ala Tyr Asn Gln Gln Leu Ser Glu Lys Arg Ala Gln 268
 GAC CGC ATC GGT TCC GAA GCT TAC AAC CAG CAG CTG TCT GAG AAA CGT GCT CAG
 759 768 777 786 795 804

Ser Val Val Asp Tyr Leu Val Ala Lys Gly Ile Pro Ala Gly Lys Ile Ser Ala 286
 TCC GTT GTT GAC TAC CTG GTT GCT AAA GGC ATC CCG GCT GGC AAA ATC TCC GCT
 813 822 831 840 849 858

Arg Gly Met Gly Glu Ser Asn Pro Val Thr Gly Asn Thr Cys Asp Asn Val Lys 304
 CGC GGC ATG GGT GAA TCC AAC CCG GTT ACT GGC AAC ACC TGT GAC AAC GTG AAA
 867 876 885 894 903 912

Ala Arg Ala Ala Leu Ile Asp Cys Leu Ala Pro Asp Arg Arg Val Glu Ile Glu 322
 GCT CGC GCT GCC CTG ATC GAT TGC CTG GCT CCG GAT CGT CGT GTA GAG ATC GAA
 921 930 939 948 957 966

Val Lys Gly Tyr Lys Glu Val Val Thr Gln Pro Ala Gly TER - C 335
 GTT AAA GGC TAC AAA GAA GTT GTA ACT CAG CCG GCG GGT TAA
 975 984 993 1002

REVENDICATIONS

1. Polypeptide utilisable comme élément d'immunogène, caractérisé en ce qu'il est porté par la séquence peptidique comprise entre
5 les résidus d'acides aminés 130 et 230 de la séquence de la protéine G du virus respiratoire syncytial du sous-groupe A et du sous-groupe B, ou par une séquence présentant au moins 80% d'homologie avec ladite séquence peptidique.
2. Polypeptide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il
10 comporte la séquence peptidique comprise entre les résidus aminoacides numérotés 174 et 187 de la protéine G du VRS ou une séquence présentant au moins 80% d'homologie avec la séquence correspondante.
3. Polypeptide selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il comporte une séquence dans laquelle :
- 15 a) l'acide aminé Cys en positions 173 et/ou 186 a été remplacé par un aminoacide ne formant pas de pont disulfure en particulier la serine, et/ou
- b) les acides aminés en positions 176 et 182 sont susceptibles de former un pont covalent autre qu'un pont disulfure notamment l'acide
20 aspartique et l'ornithine.
4. Polypeptide selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il consiste en la séquence peptidique comprise entre les résidus aminoacides numérotés 130 et 230 de la séquence de la protéine G du VRS, sous-groupe A et sous-groupe B, ou en une séquence présentant 80%
25 d'homologie avec ladite séquence peptidique.
5. Polypeptide selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il présente l'une des séquences suivantes :
- Seq id n° 5 :
Ser Ile Cys Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys.
- 30 Seq id n° 6 :
Ser Ile Cys Gly Asn Asn Gln Leu Cys Lys Ser Ile Cys Lys.
- Seq id n° 7 :
Ser Ile Cys Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Ser Lys.
- Seq id n° 8 :
35 Ser Ile Cys Gly Asn Asn Gln Leu Cys Lys Ser Ile Ser Lys.
- Seq id n° 9 :
Ser Ile Asp Ser Asn Asn Pro Thr Orn Trp Ala Ile Cys Lys.

Seq id n° 10 :

Ser Ile Asp Gly Asn Asn Gln Leu Orn Lys Ser Ile Cys Lys.

Seq id n° 11 :

Ser Ile Asp Ser Asn Asn Pro Thr Orn Trp Ala Ile Ser Lys.

5 Seq id n° 12 :

Ser Ile Asp Gly Asn ASn Gln Leu Orn Lys Ser Ile Ser Lys.

10 6. Polypeptide selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il comporte en outre au moins un résidu cystéine en position N-terminale ou C- terminale.

7. Agent immunogène, caractérisé en ce qu'il comporte un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 6 couplé à une protéine porteuse.

15 8. Agent immunogène selon la revendication 7, caractérisée en ce que la protéine porteuse est une protéine adjuvante d'immunité.

9. Agent immunogène selon l'une des revendications 7 et 8, caractérisé en ce que la protéine porteuse est une protéine OmpA.

20 10. Agent selon l'une des revendications 7 à 9, caractérisé en ce que le polypeptide est sous forme d'un conjugué soluble avec une protéine de la membrane externe d'une bactérie du genre Klebsiella.

11. Agent selon l'une des revendications 8 à 10, caractérisé en ce que la protéine adjuvante d'immunité est la protéine p40 de Klebsiella pneumoniae ou une protéine présentant 80% d'homologie avec la protéine p40.

25 12. Agent selon l'une des revendications 7 à 11, caractérisé en ce que le polypeptide est conjugué à la protéine porteuse par une protéine de liaison.

13. Agent selon la revendication 12, caractérisé en ce que la protéine de liaison est le récepteur de la sérumalbumine humaine.

30 14. Agent selon l'une des revendications 7 à 13, caractérisée en ce que ledit polypeptide est couplé à une protéine comportant la séquence id n° 13.

15. Agent selon l'une des revendications 7 à 14, caractérisé en ce que le couplage est un couplage covalent.

35 16. Agent selon l'une des revendications 7 à 15, caractérisé en ce qu'il est obtenu par voie biologique.

17. Composition utile pour la prévention et/ou le traitement des affections provoquées par le VRS, sous-groupe A et/ou sous-groupe B, caractérisée en ce qu'elle contient un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 6 ou un agent selon l'une des revendications 7 à 16.

5 18. Composition selon la revendication 17, caractérisée en ce qu'elle contient en outre des excipients pharmaceutiquement acceptables adaptés à l'administration par voie injectable.

19. Composition selon les revendications 17 et 18, caractérisée en ce qu'elle comporte un adjuvant d'immunité non spécifique.

10 20. Séquence nucléotidique, caractérisée en ce qu'elle code pour un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 6.

21. Séquence nucléotidique, caractérisée en ce qu'elle code pour une protéine comportant la séquence id n° 13.

15 22. Procédé de préparation d'un peptide conjugué entrant dans une composition selon l'une des revendications 17 et 18, caractérisé en ce que :

- 20 a) on précipite les lipopolysaccharides de membranes de bactéries du genre *Klebsiella*, en présence d'un sel de cation divalent et de détergents, pour récupérer les protéines membranaires totales dans le surnageant,
- b) on soumet les protéines à une chromatographie par échange d'anions pour séparer la fraction contenant la protéine adjuvante d'immunité,
- 25 c) on concentre la fraction contenant la protéine adjuvante d'immunité,
- d) on conjugue la protéine adjuvante d'immunité avec un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 8 pour former un conjugué soluble.

30 23. Procédé selon la revendication 22, caractérisé en ce que l'étape d) est effectuée en présence de glutaraldéhyde à des concentrations inférieures ou égales à 0,05% et durant une période supérieure ou égale à 5 jours.

24. Protéine caractérisée en ce qu'elle présente la séquence id n° 13 ou une séquence présentant 80% d'homologie.

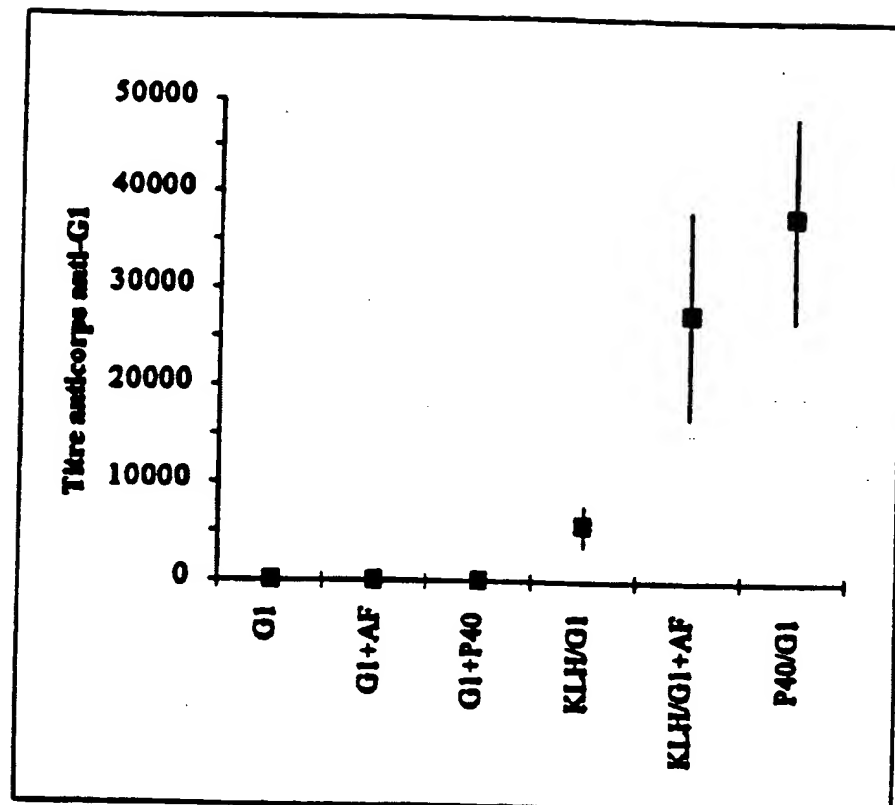


Figure 1

2/3

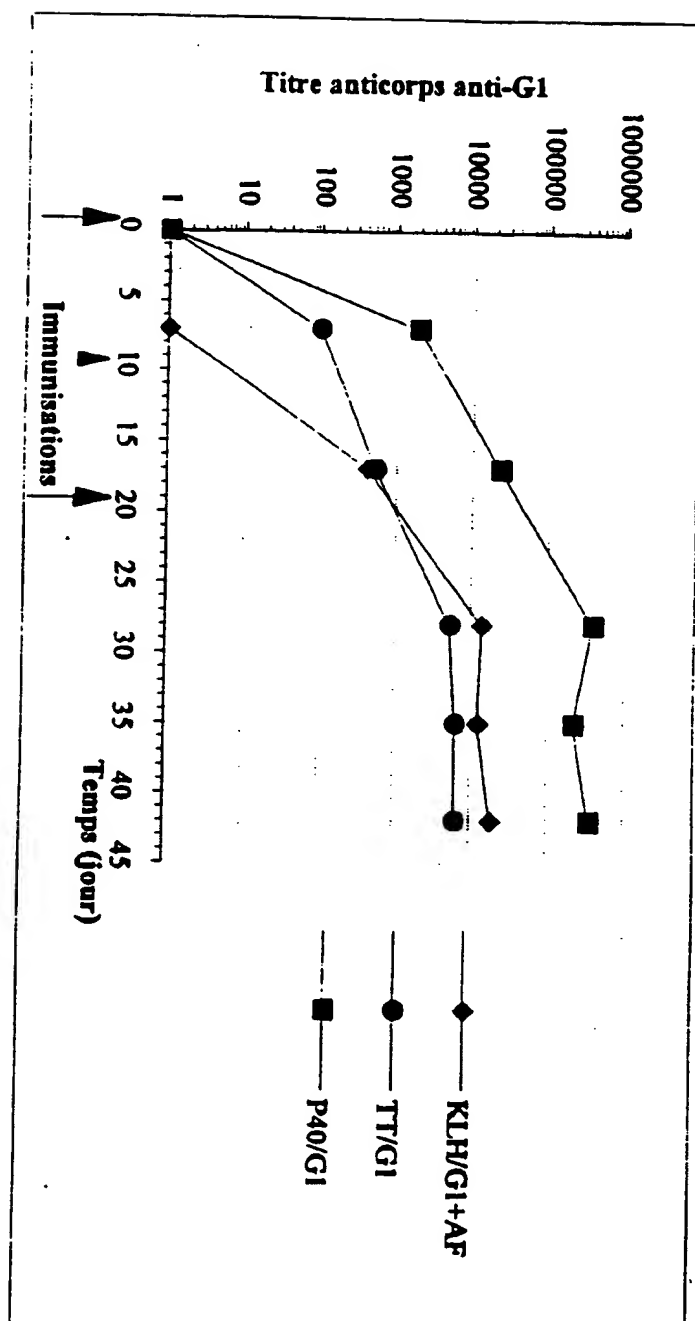


Figure 2

3/3

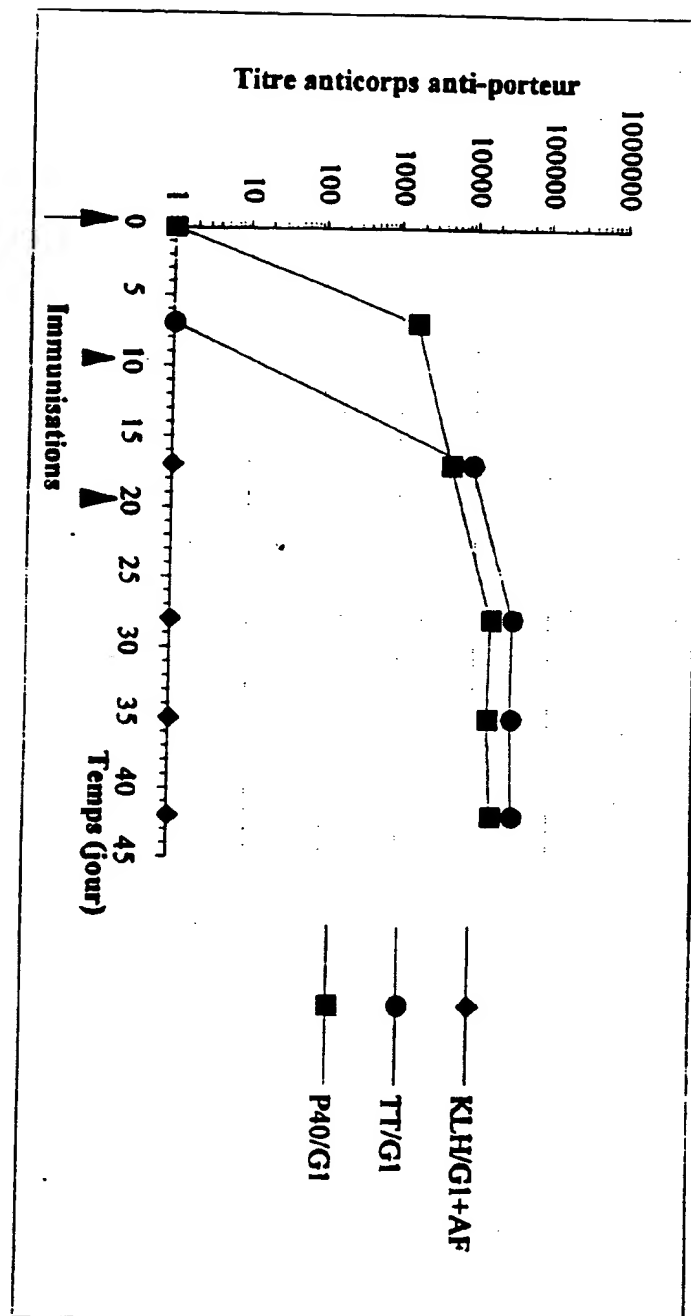


Figure 3

INSTITUT NATIONAL

de la
PROPRIETE INDUSTRIELLERAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la rechercheN° d'enregistrement
nationalFA 498256
FR 9404009

| DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | Revendications concernées de la demande examinée |
|--|--|---|
| Catégorie | Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes | |
| X | WO-A-92 20805 (PIERRE FABRE MEDICAMENT) * revendications; exemple III * --- | 1-13, 15-20 |
| X | WO-A-89 05823 (THE UPJOHN COMPANY) * page 5, ligne 21 - ligne 26 * * page 13, ligne 1 - ligne 15 * * page 13, ligne 25 - page 14, ligne 9; revendications; exemples * --- | 1-4,7, 15-18,20 |
| X | WO-A-93 14207 (CONNAUGHT LABORATORIES LIMITED) * revendications; figures 7-8; exemples 1,15-18 * --- | 1,2,7,8, 15-20 |
| A | WO-A-92 04375 (THE UPJOHN COMPANY) * revendications; exemples * --- | 1-5,7,8, 17-20 |
| A | JOURNAL OF VIROLOGY, vol.63, no.2, Février 1989 pages 925 - 932 B. GARCIA-BARRENO ET AL. 'Marked Differences in the Antigenic Structure of Human Respiratory Syncytial Virus F and G Glycoproteins' * le Discussion page 931 * --- | 1-5 |
| X | JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY, vol.137, no.8, Août 1991 pages 1911 - 1921 J.G. LAWRENCE ET AL. 'Molecular and evolutionary relationship among enteric bacteria' * figure 1 * --- M -/-- | 21,24 |
| Date d'achèvement de la recherche | | Examineur |
| 26 Janvier 1995 | | Fuhr, C |
| <p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'un moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p> | | |

2

EPO FORM 1503 (01/92) (P&C13)

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

**RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE**
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

FA 498256
FR 9404009

| DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | Revendications concernées de la demande examinée |
|--|--|---|
| Catégorie | Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes | |
| A | EP-A-0 355 737 (BEHRINGWERKE) * le document en entier * | |
| | | DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.Cl.6) |
| | | |
| Date d'achèvement de la recherche 26 Janvier 1995 | | Examinateur Fuhr, C |
| <p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p> | | |

2

EPO FORM 150 (01.92) (FR/CI)

Derwent English Abstract of French Patent No. 2 718 452
File 351:Derwent WPI 1963-2001/UD,UM &UP=200201

S1 1 PN="FR 2718452"

1/9/1

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI

(c) 2002 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

010451871

WPI Acc No: 1995-353189/ 199546

XRAM Acc No: C95-154621

New respiratory syncytial virus polypeptide(s) for vaccine prodn. - esp.
by conjugation with new Klebsiella pneumoniae p40 protein

Patent Assignee: FABRE MEDICAMENT SA PIERRE (FABR)

Inventor: BAUSSANT T; BINZ H; N'GUYEN N T; TRUDEL M; NGUYEN N T; AHNER F;

NGUYEN T N; NGUYEN N; TRUDEL M L; THIEN N N; N'GUYEN NGOC T

Number of Countries: 023 Number of Patents: 013

Patent Family:

| Patent No | Kind | Date | Applicat No | Kind | Date | Week | |
|------------|------|----------|---------------|------|----------|--------|---|
| FR 2718452 | A1 | 19951013 | FR 944009 | A | 19940406 | 199546 | B |
| WO 9527787 | A1 | 19951019 | WO 95FR444 | A | 19950406 | 199547 | |
| AU 9523109 | A | 19951030 | AU 9523109 | A | 19950406 | 199606 | |
| EP 754231 | A1 | 19970122 | EP 95916721 | A | 19950406 | 199709 | |
| | | | WO 95FR444 | A | 19950406 | | |
| JP 9511404 | W | 19971118 | JP 95526123 | A | 19950406 | 199805 | |
| | | | WO 95FR444 | A | 19950406 | | |
| BR 1100321 | A3 | 19980414 | BR 971100321 | A | 19970422 | 199821 | |
| NZ 284500 | A | 19980427 | NZ 284500 | A | 19950406 | 199823 | |
| | | | WO 95FR444 | A | 19950406 | | |
| AU 9889554 | A | 19990107 | AU 9523109 | A | 19950406 | 199913 | |
| | | | AU 9889554 | A | 19981027 | | |
| AU 708856 | B | 19990812 | AU 9523109 | A | 19950406 | 199944 | |
| NZ 329833 | A | 20000228 | NZ 329833 | A | 19950406 | 200017 | |
| | | | NZ 329833 | A | 19950406 | | |
| US 6113911 | A | 20000905 | WO 95FR444 | A | 19950406 | 200044 | |
| | | | US 96721979 | A | 19961004 | | |
| AU 728139 | B | 20010104 | AU 9523109 | A | 19950406 | 200107 | N |
| | | | AU 9889554 | A | 19981027 | | |
| EP 1111053 | A2 | 20010627 | EP 95916721 | A | 19950406 | 200137 | |
| | | | EP 2000126606 | A | 19950406 | | |

Priority Applications (No Type Date): FR 944009 A 19940406

Cited Patents: 3.Jnl.Ref; EP 355737; WO 8905823; WO 9204375; WO 9220805; WO 9314207

Patent Details:

| Patent No | Kind | Lan | Pg | Main IPC | Filing Notes |
|-----------|------|-----|----|----------|--------------|
|-----------|------|-----|----|----------|--------------|

| | | | | | |
|------------|----|--|----|--------------|--|
| FR 2718452 | A1 | | 38 | C07K-014/135 | |
|------------|----|--|----|--------------|--|

| | | | | | |
|------------|------|--|----|-------------|--|
| WO 9527787 | A1 F | | 89 | C12N-015/45 | |
|------------|------|--|----|-------------|--|

Designated States (National): AU CA JP NZ US

Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE

| | | | | | |
|------------|---|--|--|-------------|----------------------------|
| AU 9523109 | A | | | C12N-015/45 | Based on patent WO 9527787 |
|------------|---|--|--|-------------|----------------------------|

| | | | | | |
|-----------|------|--|--|-------------|----------------------------|
| EP 754231 | A1 F | | | C12N-015/45 | Based on patent WO 9527787 |
|-----------|------|--|--|-------------|----------------------------|

Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU MC NL PT SE

| | | | | | |
|------------|---|--|--|----------------|----------------------------|
| JP 9511404 | W | | | 89 C12N-015/09 | Based on patent WO 9527787 |
|------------|---|--|--|----------------|----------------------------|

| | | | |
|------------|------|--------------|----------------------------------|
| BR 1100321 | A3 | C07K-014/135 | |
| NZ 284500 | A | C07K-014/135 | Based on patent WO 9527787 |
| AU 9889554 | A | C12N-015/45 | Div ex application AU 9523109 |
| AU 708856 | B | C12N-015/45 | Previous Publ. patent AU 9523109 |
| | | | Based on patent WO 9527787 |
| NZ 329833 | A | C12N-015/31 | Div ex application NZ 329833 |
| | | | Div ex patent NZ 329833 |
| US 6113911 | A | A61K-039/155 | Based on patent WO 9527787 |
| AU 728139 | B | C12N-015/45 | Div ex application AU 9523109 |
| | | | Div ex patent AU 708856 |
| | | | Previous Publ. patent AU 9889554 |
| EP 1111053 | A2 F | C12N-015/45 | Div ex application EP 95916721 |
| | | | Div ex patent EP 754231 |

Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU MC
NL PT SE

Abstract (Basic): FR 2718452 A

New polypeptides (I) useful as immunogenic elements comprise a peptide sequence between amino acids 130 and 230 of the protein G sequence of respiratory syncytial virus (RSV) subgroup A or B, or a sequence having at least 80% homology with this sequence. Also claimed are: (1) an immunogenic agent comprising a polypeptide (I) coupled to a carrier protein; (2) a compsn. for preventing and/or treating RSV subgroup A and/or B infections contg. a polypeptide (I) or an immunogenic agent as in (1); (3) a nucleotide sequence coding for a polypeptide (I); (4) a protein (namely Klebsiella pneumoniae p40 protein) with a defined sequence of 335 amino acids given in the specification, or with 80% homology with this sequence; (5) a nucleotide sequence coding for K.pneumoniae p40 protein; and (6) a process for preparing a peptide conjugate for use in the compsn. of (2).

USE - The polypeptides are useful for prevention and/or treatment of RSV A and B infections.

ADVANTAGE - Conjugates of (I) are highly effective in inducing immunity to RSV.

Dwg.0/3

Title Terms: NEW; RESPIRATION; VIRUS; POLYPEPTIDE; VACCINE; PRODUCE;
CONJUGATE; NEW; KLEBSIELLA; PNEUMONIA; PROTEIN

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): A61K-039/155; C07K-014/135; C12N-015/09;
C12N-015/31; C12N-015/45

International Patent Class (Additional): A61K-038/16; A61K-039/12;
A61K-047/48; C07H-021/04; C07K-001/36; C07K-007/08; C07K-014/115;
C07K-014/26; C07K-014/705; C07K-014/765; C07K-019/00; C12P-021/02;
C12R-001-19

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): B04-C01G; B04-E03F; B04-N03A; B14-S11; D05-H07;
D05-H10; D05-H12A

Chemical Fragment Codes (M1):

01 D011 D601 F012 F423 H1 H100 H101 H181 H182 H4 H401 H481 H498 H8 H9
J0 J011 J012 J1 J111 J171 J172 J3 J371 M280 M311 M312 M313 M314 M315
M321 M331 M332 M333 M340 M342 M343 M349 M381 M391 M423 M510 M520
M530 M540 M620 M710 M903 M904 P210 Q233 V752 V901 V902 V913 V921
9546-09201-N 9546-09202-N

02 M423 M710 M903 Q233 V753

Generic Compound Numbers: 9546-09201-N; 9546-09202-N